动 物 学 研 究 2004, Dec. 25 (6): 538-542 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

猫视网膜年龄相关的形态学变化

孙庆艳，梅 斌，王海涛，朱再满，张长征，罗 勋，华田苗*，刘再群
(安徽师范大学 生命科学院，安徽 芜湖 241000)

摘要：取老年猫（12龄，3~3.5 kg）和青年猫（1~3龄，2~2.5 kg）各4只的视网膜，经4%多聚甲醛处理后，用H. E. 染色以显示视网膜结构，Nissl染色显示神经节细胞，免疫组织化学ABC法染色以显示星形胶质细胞特征性标志物胶质纤维酸性蛋白（GFAP）的阳性反应细胞的分布。显微镜下观察测量视网膜厚度，计数神经节细胞、GFAP免疫反应阳性细胞数。与青年猫比较，老年猫视网膜总厚度以及外核层、外网状层、内核层和内网状层厚度均显著减小；神经节细胞层的细胞密度显著下降；GFAP免疫反应阳性细胞显著增加，GFAP阳性细胞阳性反应强，胞体明显膨胀，突起稠密粗大。推测在衰老过程中视网膜细胞有神经元丢失现象，可能是造成视觉功能衰退的重要原因之一；视网膜星形胶质细胞的功能增强可能会延缓衰老。

关键词：猫；视网膜；年龄；形态学变化；星形胶质细胞；胶质纤维酸性蛋白
中图分类号：Q959.832；Q419 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2004)06-0538-05

Age-related Morphological Changes in the Retina of Cats

SUN Qing-yan, MEI Bin, WANG Hai-tao, ZHU Zai-man, ZHANG Chang-zheng, LUO Xun, HUA Tian-miao*, LIU Zai-qun
(*College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu, Anhui 241000, China*)

Abstract: The retinae of 4 old cats (12 years, 3-3.5 kg) and 4 young cats (1-3 years, 2-2.5 kg) were selected. After treated in 4% paraformaldehyde, we applied Hematoxylin-Eosin and Nissl staining to exhibit the structure of the retinae and ganglion cells respectively, and also we used immunohistochemical ABC method to display the distribution of GFAP-immunoreactive (GFAP-IR) cells that were specifically classified as the astrocytes. By microscope we observed the thickness of retinae, counted the numbers of ganglion cells and GFAP-IR cells. Compared with young cats, the retinae in old cats presented a significant decrease in the thickness of total retina, outer nuclear layer, outer plexiform layer, inner nuclear layer, inner plexiform layer as well as an evidently lower density of ganglion cells. Also old cats showed clearly larger number and stronger staining of GFAP-IR cells than did in young cats, and at the same time the GFAP-IR cell bodies and dendrites swelled obviously in old cats. We presume that neurons lose in old cats, which hints that the loss of retinal cells might be of an important factor mediating visual functional declines during senescence. The functional increase of astrocytes may suspend more aging.

Key words: Cat; Retina; Age; Morphological change; Astrocyte; GFAP

人与动物的视觉功能随年龄增长而衰退，表现在视觉感知［如视锐度（acuity）、对比敏感度（contrast sensitivity）］和波长敏感性下降，以及对视觉刺激选择性降低等（Weale，1975；Ross et al，1985；Owsley & Sloane，1987；Owsley et al，1990；Elliott et al，1990；Nomura et al，2003）。目前已有不少研究显示视觉中枢结构变化（如神经元丢失、树突改变及突触密度下降等）以及生理功能（如皮层内GABA能抑制作用减弱等）改变是视觉衰退的神经基础（Leventhal et al，2003；Mendelson & Wells，2002；Vidal et al，2004）。而视网膜是接受视觉信息加工的初级结构，其年老性的结构及功能

收稿日期：2004-06-15；接受日期：2004-09-29
基金项目：安徽省自然科学基金（98241716）；安徽省教育厅科研基金（2003kj152；2004kj177）；安徽省重点实验室科研基金；安徽师范大学青年基金（2004xqn09）资助项目
* 通讯作者（Corresponding author），Tel：0553-3869669，E-mail：tmhua@mail.ustc.edu.cn

变化很可能会引起视觉功能衰退。有部分实验已证明老年大鼠（Cano et al，1986；Cavallotti et al，2001；Katz & Robison，1986）、小鼠（Shoji et al，1998）和人（Harman et al 2000；Cavallotti et al，2004；Panda-Jonas et al，1995）的视网膜厚度变薄，神经元有丢失现象，而传统的视觉系统研究模式动物——猫年龄相关的视网膜形态学变化尚无报道。本文比较研究了老年和青年猫在视网膜水平上的年龄差异，以期为揭示视觉衰退的神经机制提供基础性研究资料。

1 材料与方法

1.1 材 料

用眼底镜检查，选用无视觉缺陷的老年猫（12龄，3～3.5 kg）和青年猫（1～3龄，2～2.5 kg）各4只。盐酸氯胺酮（1 mL/kg）深麻醉后开胸，用0.9%的生理盐水从左心室灌流，至肝脏发白后灌注约500 mL的4%多聚甲醛进行预固定，接着摘除眼球解剖游离出视网膜；取视网膜中央区于4%多聚甲醛中固定20～24 h后，PBS冲洗，常规脱水、透明、石蜡包埋，连续切片厚6 μm，裱片于经APES处理的载玻片上，备组织染色和免疫组织化学染色。

1.2 免疫组织化学及常规组织学染色

每隔10张切片取一张用于免疫组织化学染色：切片脱蜡至水，3% H_2O_2 室温孵育5 min，以消除内源性过氧化物酶活性；蒸馏水冲洗，PBS浸泡5 min；滴加正常山羊血清，室温孵育10 min，封闭非特异性反应部位；倾去血清，勿洗，滴加一抗（兔抗人即用型GFAP抗体）37 ℃孵育1 h；PBS冲洗5 min×3；滴加生物素标记二抗（羊抗兔IgG抗血清），37 ℃孵育10 min；PBS冲洗5 min×3；滴加辣根酶标记三抗（链酶卵白素，ABC），37 ℃孵育10 min，PBS冲洗5 min×3；DAB显色，自来水冲洗，苏木精复染，脱水，透明，封片。阴性对照实验采用正常山羊血清和PBS代替一抗，其余步骤同上。实验所用GFAP的兔抗人血清及免疫组织化学SP试剂盒、DAB购于Zymed公司。相邻切片用H．E．染色以显示视网膜结构、测量视网膜厚度。Nissl染色显示神经节细胞：石蜡切片脱蜡至水，0.05%甲苯胺蓝（含1%硼砂）染色5 min，脱水，透明，封片。

1.3 观察和统计分析

染色后的切片在Olympus BX51型显微镜下观察拍照。对Nissl染色、GFAP显色的切片，每张切片在光镜（×400）下随机选取8个视野，使采集网格（130 μm×130 μm）的两平行边与视网膜的表面垂直，计数采集网格内的神经节细胞数及GFAP免疫反应阳性（GFAP-IR）细胞数目，并换算成线密度（细胞数/mm）。对H．E．染色的切片，每张切片上随机选取8个视野测量视网膜总厚度及各层厚度（m），并计算平均值。所有数据采用平均值±标准差表示，用 t-test进行各指标的显著性检验。

2 结 果

2.1 视网膜厚度变化

组织染色后视网膜的10层结构清晰易辨（图1—4）。光镜不易分辨其他层厚度，故选视网膜总厚度以及其中4层的厚度进行比较。与青年猫比较，老年猫视网膜总厚度、外核层、外网状层、内核层和内网状层厚度均显著减小（$P<0.01$）（表1）：视网膜总厚度平均下降15.7 %，其中外核层、

表1 老年与青年猫的视网膜厚度、神经节细胞和GFAP-IR细胞密度

Table 1 Thickness, density of ganglion cells and GFAP-IR cells of the retinae in old and young cats

	青年猫 Young cat ($n=8$)	老年猫 Old cat ($n=8$)
视网膜 Retina (mm)	0.1577±0.0144	0.1329±0.0136*
外核层 Outer nuclear layer (mm)	0.0461±0.0020	0.0368±0.0041*
外网状层 Outer plexiform layer (mm)	0.0234±0.0037	0.0115±0.0033*
内核层 Inner nuclear layer (mm)	0.0201±0.0020	0.0149±0.0015*
内网状层 Inner plexiform layer (mm)	0.0293±0.0010	0.0182±0.0015*
神经节细胞密度（细胞数/mm）Number of ganglion (cells/mm)	67.179±12.442	30.256±8.555*
GFAP-IR细胞密度（细胞数/mm）Number of GFAP-IR (cells/mm)	26.923±10.642	79.231±21.865*

* $P<0.01$ (t-test)。

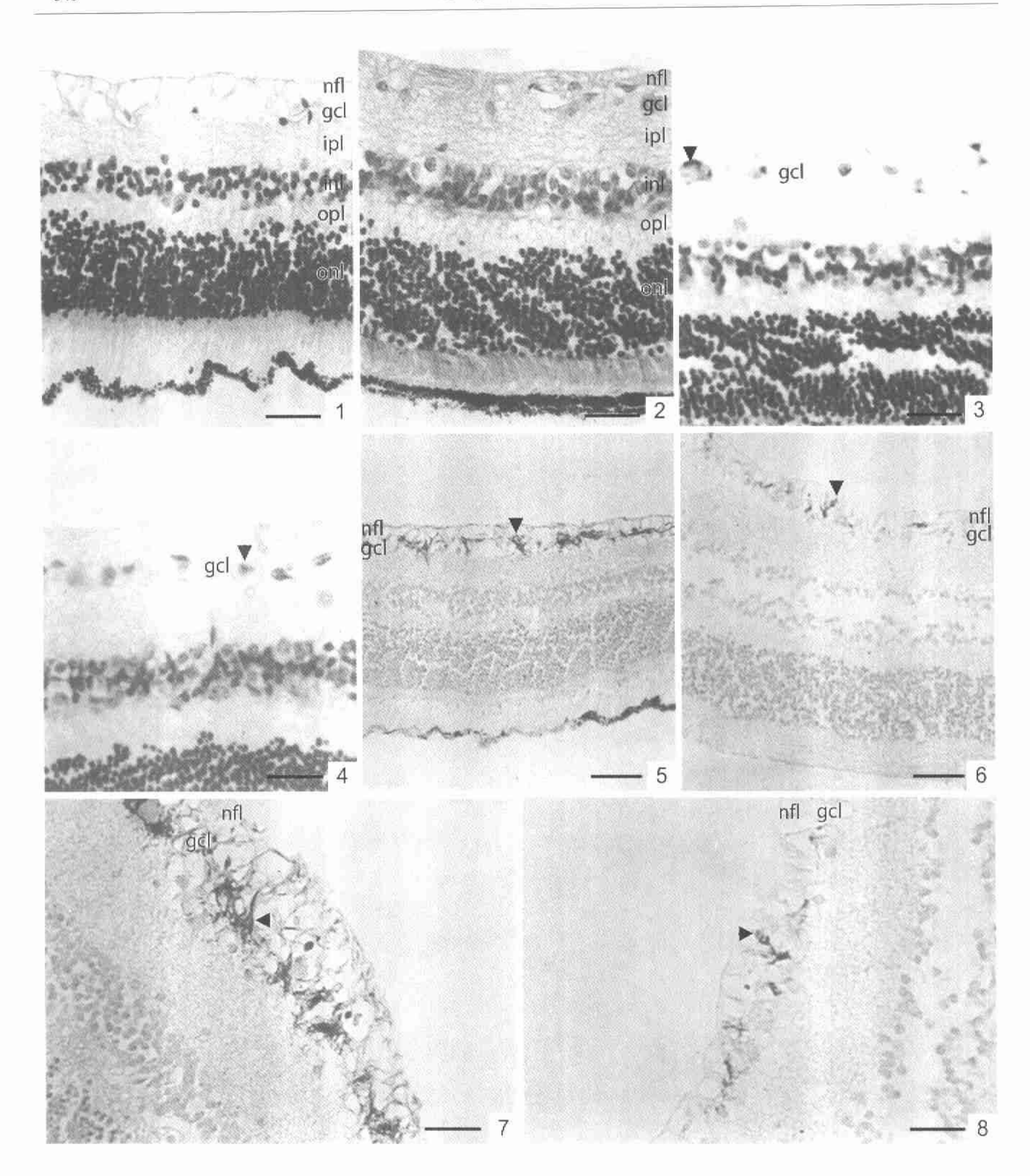


图 1—8 老年和青年猫视网膜结构、神经节细胞及GFAP免疫反应阳性细胞

Figs.1－8 Microscopic structure, ganglion cells and GFAP-IR cells of the retinae in old and young cats

onl: 外核层 (Outer nuclear layer); opl: 外网状层 (Outer plexiform layer); inl: 内核层 (Inner nuclear layer); ipl: 内网状层 (Inner plexiform layer); gcl: 神经节细胞层 (Ganglion cells layer); nfl: 神经纤维层 (Nerve filament layer)。

1, 3, 5, 7为老年猫视网膜: 1. 视网膜结构; 3. 神经节细胞 (箭头); 5、7. 神经节细胞层、神经纤维层的GFAP免疫反应阳性细胞 (箭头) [Microscopic structure of the retinae (1), the ganglion cells (3, arrowheads), the GFAP-IR cells (arrowheads) of ganglion cells layer (5), nerve filament layer (7) in the old cat]

2, 4, 6, 8为青年猫视网膜: 2. 视网膜结构; 4. 神经节细胞 (箭头); 6、8. 神经节细胞层、神经纤维层的GFAP免疫反应阳性细胞 (箭头) [Microscopic structure of the retinae (2), the ganglion cells (4, arrowheads), the GFAP-IR cells (arrowheads) of ganglion cells layer (6), nerve filament layer (8) in the young]

比例尺: 图1—4、7—8: 25 μm; 图5—6: 50 μm [scale bar: Figs.1－4, 7－9: 25 μm; Figs.5－6: 50 μm]。

外网状层、内核层和内网状层厚度分别平均下降20.2%、50.5%、25.9%和37.9%。外网状层下降幅度最大。神经节细胞层的神经细胞密度明显下降，老年猫与青年猫差异显著（$P<0.01$）。

2.2 免疫组织化学结果

老年和青年猫视网膜中GFAP-IR细胞均存在于神经节细胞层和神经纤维层。但老年猫视网膜GFAP-IR细胞数显著多于青年猫（表1）；GFAP-IR细胞阳性反应强（图5，7）：遍布胞浆及突起的棕黄色免疫染色，胞体明显膨胀，突起稠密粗大，相邻的细胞突起相互交织成网状；细胞大都呈星形。而在青年猫视网膜中（图6，8），GFAP-IR细胞阳性反应较弱，胞体较小，突起少而短。阴性对照组未见阳性反应。

3 讨论

我们对老年猫视网膜总厚度及其中4层厚度的研究结果与对老年大鼠（Cano et al，1986；Cavallotti et al；2001）、老年人（Cavallotti et al，2004）视网膜的研究结果一致。老年猫视网膜各层厚度均下降，其中内核层和外核层下降幅度较小，外网状层和内网状层下降幅度较大，提示衰老过程中视网膜各层次的变化程度不同。很多研究资料（Katz & Robison，1986；Cano et al，1986；Cavallotti et al，2001；Shoji et al，1998；Panda-Jonas et al，1995；Harman et al，2000）认为视网膜在衰老过程中有神经元丢失现象。但也有实验结果（Harman et al，2003；Harman & Moor，1999）不支持这一观点，认为仅是神经元形态结构发生了改变，不涉及数量变化。视网膜的主要神经细胞有视细胞、水平细胞、双极细胞、无长突细胞和神经节细胞。视细胞的胞体组成外核层；水平细胞、双极细胞以及无长突细胞的胞体组成内核层；神经节细胞的胞体组成神经节细胞层。视细胞、双极细胞和神经节细胞构成视觉信息传导的视细胞—双极细胞—神经节细胞链；水平细胞和无长突细胞形成了视网膜中的侧向链。我们的研究结果表明：与青年猫相比，老年猫视网膜外核层、内核层厚度显著变薄，且神经节细胞密度也显著下降，说明有神经元丢失。由此推测视网膜中这些细胞的丢失可能是造成老年猫视觉功能衰退的重要原因之一。

胶质纤维酸性蛋白（glial fibrillary acid protein，GFAP）是星形胶质细胞（astrocyte，AS）的特异性标志蛋白，其表达的高低可反应胶质细胞的功能活动状态（Bigini et al，2001）。星形胶质细胞不同于神经细胞，具有较大的可塑性。具有以下功能：第一，在神经元之间起支持作用，它可产生多种胶质源性的细胞外基质（glial-derived extracellular matrix），为神经元提供丰富的粘着基质。第二，伸向毛细血管的突起膨大形成血管周足，能吸收血液中的营养物质输送给神经元并参与代谢产物的排出；同时周足也在神经元和血液之间形成屏障，能选择性地让某些物质通过，使神经元周围形成相对恒定的微环境，以保证神经元正常的生理功能（Duan & Li，1999）。第三，脑损伤、脑缺血等引起细胞死亡或凋亡时，胶质细胞出现反应性增生（hyperplasia）和生长（hypertrophy）（Caccuri et al，2003）。第四，参与信息的传递，能与相应的神经递质或调质相结合并被激活（Fields & Stevens，2000；Temburni & Jacob，2001），合成并释放某些神经递质或神经调质影响周围的神经元（Araque et al，2001）；通过广泛的缝隙连接（gap junction）与周围的细胞形成合胞体，以介导细胞之间的快速通讯（Kirchhoff et al，2001），形成神经元—胶质细胞或胶质细胞—神经元的信息网络。

免疫组织化学方法的研究结果表明，在老年哺乳动物或病理状态下耳蜗核（Jalenques et al，1995）、小脑皮质（Sabbatini et al，1999）及视网膜（Ramirez et al，2001；Lewis & Fisher，2003）GFAP-IR细胞数目增多，阳性反应增强，胞质膨胀；电镜观察发现，老年性黄斑变性（age-related macular degeneration，AMD）及老年人视网膜中的星形胶质细胞胶质纤维密度增加，且细胞器数量增多（Ramirez et al，2001）。我们的老年猫视网膜GFAP-IR细胞数显著增多、免疫反应较强的结果，与上述一致，表明在衰老过程中视网膜星形胶质细胞的功能增强。进而推测，老年动物视网膜中星形胶质细胞的增生和功能活动增强亦可能由视网膜细胞，特别是神经节细胞的丢失触发的。其增生可能具有以下作用：①填充神经节细胞丢失所产生的基质空缺，维持老年视网膜的形态；②为视网膜神经元输送营养，促进神经元代谢，延缓细胞进一步衰老；③增加视网膜胶质细胞与神经元以及神经元与神经元的通讯联系，借以实现基本的视觉信息处理功能。

致谢： 感谢中国科技大学视觉研究实验室为我们提供珍贵的老年猫材料。

参考文献：

Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. 2001. Dynamic signaling between astrocyte and neurons [J]. *Annu. Rev. Physiol.*, **63** (1): 795-813.

Bigini P, Bastone A, Mennini T. 2001. Glutamate transporters in the spinal cord of the wobbler mouse [J]. *Neuroreport*, **12** (9): 1815-1820.

Caccuri RL, Iacono RF, Weissenbacher MC, Avila MM, Berria MI. 2003. Long-lasting astrocyte reaction to persistent Junin virus infection of rat cortical neurons [J]. *J. Neural. Transm.*, **110** (8): 847-857.

Cano J, Machado A, Reinoso-Suarez F. 1986. Morphological changes in the retina of ageing rats [J]. *Arch. Gerontol. Geriatr*, **5** (1): 41-50.

Cavallotti C, Artico M, Pescosolido N, Feher J. 2001. Age-related changes in rat retina [J]. *Jpn. J. Ophthalmol.*, **45**: 68-75.

Cavallotti C, Artico M, Pescosolido N, Leali FM, Feher J. 2004. Age-related changes in the human retina [J]. *Can. J. Ophthalmol.*, **39** (1): 61-68.

Duan XL, Li J. 1999. Basic tissue [A]. In: Zhou MJ, Duan XL. Human Histology and Anatomy [M]. Beijing: Higher Education Publishing House. 47. [段相林，李 健. 1999. 基本组织. 见：周美娟，段相林. 人体组织学与解剖学. 北京：高等教育出版社. 47.]

Elliott D, Whitaker D, MacVeigh D. 1990. Neural contribution to spatiotemporal contrast sensitivity decline in healthy ageing eyes [J]. *Vision Res.*, **30**: 541-547.

Fields RD, Stevens B. 2000. ATP: An extracellular signaling molecule between neurons and glia [J]. *Trends Neurosci.*, **23** (12): 625-633.

Harman AM, Moore S. 1999. Number of neurons in the retinal ganglion cell layer of the quokka wallaby do not change throughout life [J]. *Anat. Rec.*, **256** (1): 78-83.

Harman A, Abrahams B, Moore S, Hoskins R. 2000. Neuronal density in the human retinal ganglion cell layer from 16-77 years [J]. *Anat. Recm.*, **260** (2): 124-131.

Harman AM, MacDonald A, Meyer P, Ahmat A. 2003. Numbers of neurons in the retinal ganglion cell layer of the rat do not change throughout life [J]. *Gerontology*, **49** (6): 350-355.

Jalenques I, Albuisson E, Despres G, Romand R. 1995. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the cochlear nucleus of adult and aged rats [J]. *Brain Research*, **686**: 223-232.

Katz ML, Robison WG Jr. 1986. Evidence of cell loss from the rat retina during senescence [J]. *Exp. Eye Res.*, **42** (4): 293-304.

Kirchhoff F, Dringen R, Giaume C. 2001. Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection [J]. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, **251**: 159-169.

Leventhal AG, Wang Y, Pu M, Zhou Y, Ma Y. 2003. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys [J]. *Science*, **300** (5620): 812-815.

Lewis GP, Fisher SK. 2003. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: Its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression [J]. *Int. Rev. Cytol.*, **230**: 263-290.

Mendelson JR, Wells EF. 2002. Age-related changes in the visual cortex [J]. *Vision Research*, **42**: 695-703.

Nomura H, Ando F, Niino N, Shimokata H, Miyake Y. 2003. Age-related change in contrast sensitivity among Japanese adults [J]. *Jpn. J. Ophthalmol.*, **47**: 299-303.

Owsley C, Sloane ME. 1987. Contrast sensitivity, acuity, and the perception of 'real-world' targets [J]. *Br. J. Ophthalmol.*, **71**: 791-796.

Owsley C, Sloane ME, Skalka HW, Jackson CA. 1990. A comparison of the regan low-contrast letter charts and contrast sensitivity testing in older patients [J]. *Clin. Vision Sci.*, **5**: 325-334.

Panda-Jonas S, Jonas JB, Jakobczyk-Zmija M. 1995. Retinal photoreceptor density decreases with age [J]. *Ophthalmology*, **102** (12): 1853-18559.

Ramirez JM, Ramirez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Trivino A. 2001. Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration [J]. *Eye Res.*, **73**: 601-615.

Ross JE, Clarke DD, Bron AJ. 1985. Effect of age on contrast sensitivity function: Uniocular and binocular findings [J]. *Br. J. Ophthalmol.*, **69**: 51-56.

Sabbatini M, Barili P, Bronzetti E, Zaccheo D, Amenta F. 1999. Age-related changes of glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in the rat cerebellar cortex [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, **108**: 165-172.

Shoji M, Okada M, Ohta A, Higuchi K, Hosokawa M, Honda Y. 1998. A morphological and morphometrical study of the retina in aging SAM mice [J]. *Ophthalmic Res.*, **30** (3): 172-179.

Temburni MK, Jacob MH. 2001. New function for glia in brain [J]. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** (7): 3631-3632.

Vidal L, Ruiz C, Villena A, Diaz F, Perez de Vargas I. 2004. Quantitative age-related changes in dorsal lateral geniculate nucleus relay neurons of the rat [J]. *Neuroscience Research*, **48**: 387-396.

Weale RA. 1975. Senile changes in visual acuity [J]. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK*, **95**: 36-38.